

Analiza sastava bubrežnih kamenaca FTIR spektroskopijom: dvadestogodišnje iskustvo

Vatroslav Šerić¹, Vesna Babić-Ivančić^{2,4}, Hrvoje Kuveždić^{2,3}, Antun Tucak²

¹Klinički bolnički centar Osijek, Odjel za kliničku laboratorijsku dijagnostiku, Huttlerova 4, 31000 Osijek, Hrvatska

²Medicinski fakultet Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku, J. Huttlera 4, 31000 Osijek, Hrvatska,

³Klinički bolnički centar Osijek, Klinika za urologiju, Referentni centar za urolitijazu Ministarstva zdravstva Republike Hrvatske, J. Huttlera 4, 31000 Osijek, Hrvatska,

⁴Institut Ruđer Bošković, Bijenička c. 54, 10000 Zagreb, Hrvatska

Autor za korespondenciju: Vatroslav Šerić

Klinički bolnički centar Osijek, Odjel za kliničku laboratorijsku dijagnostiku, J. Huttlera 4, 31000 Osijek, Hrvatska,
Stručni članak

UDK 616.613-003.7:543.42

Prispjelo: srpanj 2010.

Točna i pouzdana analiza kemijskoga sastava bubrežnih kamenaca s definiranjem kristalnih komponenti koje se nalaze u sastavu kamenaca preduvjet je za djelotvorno medicinsko praćenje osoba koje stvaraju bubrežne kamence. Ona može značajno olakšati procjenu i tretman u takvim slučajevima.

Za utvrđivanje sastava kamenaca koriste se brojne fizikalno kemijske tehnike. FTIR spektroskopija fizikalna je metoda za analizu kamenaca koja koristi sofisticiranu instrumentaciju, a zahtijeva usporedbu uzorka s poznatim standardima. U radu je prikazano dvadestogodišnje iskustvo kliničkoga laboratorija u IR analizi sastava bubrežnih kamenaca.

Glavne kristalne supstance koje se mogu naći u kamencima podijeljene su u šest glavnih grupa: kalcij oksalat, kalcij fosfat, infektivni kamenci, uratni kamenci, cistin i ostali.

Cljučne riječi: Urolitijaza, bubrežni kamenci – kemija, epidemiologija, urin; spektroskopija - infracrvena, metoda

Uvod

Urolitijaza je bolest urinarnoga trakta kod koje dolazi do stvaranja mokraćnih kamenaca u različitim dijelovima bubrega i mokraćnoga mjehura tijekom specifičnoga procesa patološke biomineralizacije. Mokraćni kamenci se pojavljuju u bubrežnom pelvisu, ureteru ili mokraćnom mjehuru. Većinu mokraćnih kamenaca čine bubrežni kamenci, dok se kamenci stvoreni u mokraćnom mjehuru javljaju sporadično. Osim stvaranja kamenaca, može se dogoditi i kalcifikacija bubrežnoga parenhima koja se označava kao nefrokalcinoza. Prisutnost kamenaca u urinarnom traktu može dovesti do opstrukcije bubrežnih kanalića s gubitkom bubrežnoga tkiva i bubrežne funkcije, hematurije i infekcije. Prolaz kamenca uzrokuje bubrežne kolike, praćene žestokom boli, što je razlog čestoj hospitalizaciji osoba s takvim poteškoćama (1).

Urolitijaza predstavlja ozbiljan zdravstveni i socioekonomski problem jer se najčešće javlja u najproduktivnijoj ljudskoj dobi između 30. i 50. godine života. Osim toga, očigledno je da se njena učestalost neprestano povećava tijekom zadnjih desetljeća. Na pojavu i učestalost bubrežnih kamenaca mogu utjecati genetski, nutritivni i ekološki čimbenici. Urolitijaza je prisutna širom svijeta, ali je njena učestalost različita s obzirom na pojedine zemlje, odnosno određene regije. U svjetskim razmjerima ona se kreće u rasponu od 0.1 do 0.5% na godinu sa stupnjem recidiva od 80%. Utvrđeno je da će se kod 12% muškaraca i 5% žena razviti bolest bubrežnih kamenaca u dobi do 70-te godine života. Učestalost pojave bubrežnih kamenaca podjednaka je za oba bubrega, a kod

40% bolesnika prisutni su kamenci u oba bubrega. Bolest je dva do tri puta češća kod muškaraca nego kod žena (2).

Značajno je naglasiti da urolitijaza kao bolest prati ljudski rod od najstarijih vremena, na što ukazuju i urinarni kamenci pronađeni na mumiji u Egiptu, još prije 7000 godina.

Povećana učestalost urolitijaze u novije vrijeme obnovila je interes znanstvenika za razjašnjenje patofiziologije stvaranja kamenaca. Nužna je ozbiljna i točna morfološka i strukturalna analiza kemijskoga sastava kamenaca, bilo da su spontano izmokreni ili su operativno izvađeni. Ona daje važne informacije o većini važnih fizikalno kemijskih uvjeta koji pridonose stvaranju i rastu kamenaca kod određenih osoba. Točna analiza kemijskoga sastava mokraćnih kamenaca s definiranjem kristalnih komponenti koje se nalaze u sastavu kamenaca preduvjet su za djelotvorno medicinsko praćenje osoba koje stvaraju bubrežne kamence. Ona može značajno olakšati procjenu i tretman u takvim slučajevima.

Prema morfološkom izgledu za kamence kalcij oksalata monohidrata karakteristično je da su tamnosmeđe obojeni, sadrže tamnosivu prevlaku i tvrde su konzistencije. Na presjeku takvih kamenaca očita je radialna slika rasta, a nidus s klinovima zaokružuje njihove krajeve stvarajući uglavnom glatku vanjštinu. Kamenci kalcij oksalat dihidrat su obično mali i sferični i sadrže žutosmeđe ili žute nakupine pločica. Pločice su oštre i orijentirane u različitim smjerovima. Kamenc s primjesom monohidrata/dihidrata često ima mnoge karakteristike dihidrata budući da se dihidrat najčešće pojav-

ljuje na površini miješanoga kamenca. Ti su kamenci normalno veći od kamenaca čistoga dihidrata i imaju žute nakupine pločica okolo po tvrdoj tamnosmeđoj unutrašnjosti. Pločice su oštre i različito orijentirane. Povremeno unutrašnjost može biti svijetlosmeđe boje s granularnom konzistencijom. Bubrežni kamenci sastavljeni od čistoga apatita obično su mali, bijele boje s vrlo finom granularnom površinom i mekom bijelom, kredi sličnoj unutrašnjosti. Povremeno ti kamenci mogu biti svijetlosmeđi s glatkom sjajnom površinom. Kamenci s primjesom apatita/kalcijoksalata monohidrata/kalcij oksalata dihidrata općenito su glatki sferični sa svijetlosmeđim pločicama na površini. Unutrašnjost je pločasta s bijelim i svijetlosmeđim područjima. Često se s jedne strane kamenca mogu opaziti papilarni cilindri s apatitom lociranim u cilindru začetku koji predstavljaju začetak prvoga depozita tvari. Dihidratne ploče se normalno nalaze na suprotnoj strani od papilarnih cilindara.

U analizi sastava bubrežnih kamenaca koriste se brojne fizikalne i kemijske tehnike. One uključuju kristalografsku difrakciju X-zraka (XRD), infracrvenu spektroskopiju (IR), Ramanovu spektroskopiju, elektronsku skenirajuću mikroskopiju (SEM), elektronsku transmisijsku mikroskopiju (TEM), kompjutoriziranu tomografiju, klasičnu kemijsku analizu, optičku kristalografiju, termalnu gravimetrijsku analizu i sl. Najčešće tehnike koje se koriste u rutinskoj analizi kamenaca jesu optička kristalografija, infracrvena spektroskopija, klasična kemijska analiza i kristalografska difrakcija X-zraka. Najveći stupanj pouzdanosti za korektnu analizu kamenaca nude infracrvena spektroskopija i kristalografska difrakcija.

IR spektroskopijom se mjere vibracije atoma u vezama (istezanja ili sabijanja veza) prolaskom infracrvenoga zračenja kroz praškasti uzorak kamenca, koji je sprešan u gotovo transparentnu pastilu zajedno s kalij bromidom. IR spektri sadrže apsorpcijske maksimume koji predstavljaju specifičnu energiju (prikazanu kao valna duljina u cm^{-1} , ili češće zvanu valni brojevi) koje odgovaraju molekularnim gibanjima u molekulama. Moguće je razlučiti molekularna gibanja u organskim funkcionalnim skupinama kao što su npr. atomi kisika u karbonilnoj ili karboksilnoj skupini. IR spektri kamenaca sa smjesom komponenti često su vrlo kompleksni. Stvarna prednost FTIR-a (Fourier transform infrared) visoko je osjetljivi kompjutorski kontrolirani spektrofotometar koji može uzeti mnogo ponovljenih spektara istoga uzorka i matematički pojačati signal koji daje uzorak iznad eksperimentalnoga šuma. Moguće je dobiti konačan spektar iz manje materijala nego što je to potrebno za XRD (3).

Rezultati morfološke analize i analize kemijskoga sastava bubrežnih kamenaca u zapadnim zemljama, zadnjih 40-tak godina pokazali su značajno povećanje udjela kalcij oksalata kao glavne komponente za razliku od cistinskih i uratnih kamenaca čija učestalost pojavljivanja je nepromijenjena. Uočeno je značajnije sniženje učestalosti tzv. infektivnih kamenaca. Pažljiva morfološka i strukturalna analiza kamenaca, bilo da su spontano izmokreni ili su operativno izvađeni, daje važne informacije o većini važnih fizikalno kemijskih uvjeta koji pridonose stvaranju i rastu kamenaca kod određenih osoba. Današnja klasifikacija bubrežnih kamenaca

temelji se uglavnom na kemijskom sastavu i epidemiološkim zapažanjima. Povezivanje biokemijskih i kliničkih podataka s pojedinim tipom, odnosno podtipom kamenaca u većini slučajeva pokazuje da klasifikacija kamenaca može biti vrlo uspješan indikator u etiopatogenezi kamenaca. Analizom kemijskoga sastava bubrežnih kamenaca s odvojenim analiziranjem jezgre, pojedinih slojeva i ovojnice kamenca mogu se dobiti informacije o uvjetima prisutnim u vrijeme nukleacije i postupnoga rasta kristala. Rekonstrukcija događaja stvaranja kamenca je informacija od izuzetne važnosti. Komponente u sastavu kamenca mogu biti mineralnoga i organskoga porijekla. Često se u istom kamencu susreću komponente i jedne i druge vrste. Kao komponente bubrežnih kamenaca mogu se pojaviti oko 65 različitih vrsta molekula, uključujući 25 egzogenih molekula. Neke kemijske komponente mogu kristalizirati u različitim formama. Kalcij oksalat može biti prisutan kao monohidrat (COM), dihidrat (COD) ili trihidrat (COT). Različite kristalne forme komponenti povezuju se s različitim biokemijskim zbivanjima u tijeku nastanka. Važna zadaća u analizi sastava kamenaca pored identifikacije molekulskih vrsta prisutnih u kamencu jest i utvrđivanje njihovih kristalnih formi. Većina kamenaca je miješanoga sastava, a od heterogenih kamenaca oko 80% su kamenci sastavljeni od kalcij oksalata (CaOx) i kalcij fosfata (CaP) u različitim omjerima. Za razliku od njih prisustvo jedne, ali neuobičajene kemijske komponente kao što je npr. 2,8-dihidroksiadenin, ksantin, cistin i slične lagano definiraju specifičan tip urolitijaze (4).

Cilj

Cilj ovoga rada bio je prikazati način rada i dosadašnje iskustvo u analizi kemijskoga sastava bubrežnih kamenaca metodom FTIR spektroskopije na Odjelu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku, Kliničkoga bolničkog centra Osijek.

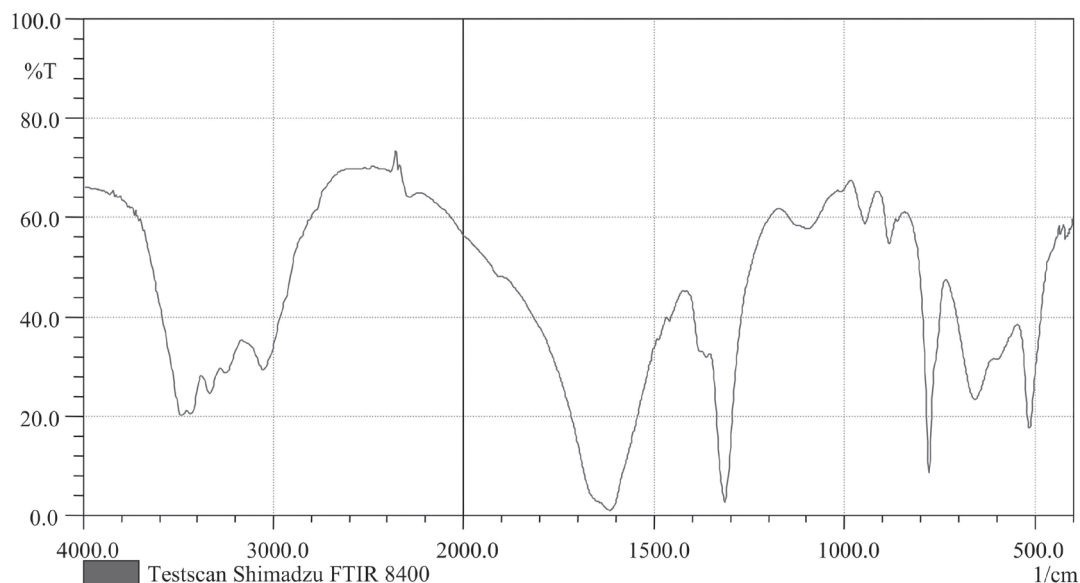
Ispitanici i metode

U ovom je radu prikazan način rada i rezultati analize kemijskoga sastava bubrežnih kamenaca te stečena iskustva u razdoblju od 1989. do 2009. godine. Za to vrijeme analizirano je 3120 kamenaca koji su dostavljeni s Klinike za urologiju, Kliničkoga bolničkog centra Osijek ili su zaprimljeni iz različitih ambulanti od vanjskih pacijenata.

U uzorcima bubrežnih kamenaca analiziran je kemijski sastav FTIR spektroskopijom (Fourier transform infrared) na instrumentu FTIR-8400 spektrofotometru, od firme Shimadzu, Japan. Za analizu se pripremi mala količina usitnjenoga uzorka mokraćnoga kamenaca (oko 1,5 mg) i pomiješa s određenom količinom (oko 300 mg) kalijevoga bromida u prahu, spektroskopske čistoće, nakon čega se uzorak spreša u prozirnu KBr pastilu koja se stavlja u IR spektrofotometar na snimanje spektra. Identifikacija dobivenoga spektra provodi se njegovom usporedbom s infracrvenim spektrima kemijski čistih spojeva prikazanih u katalozima ili pohranjenih u obliku baze podataka.

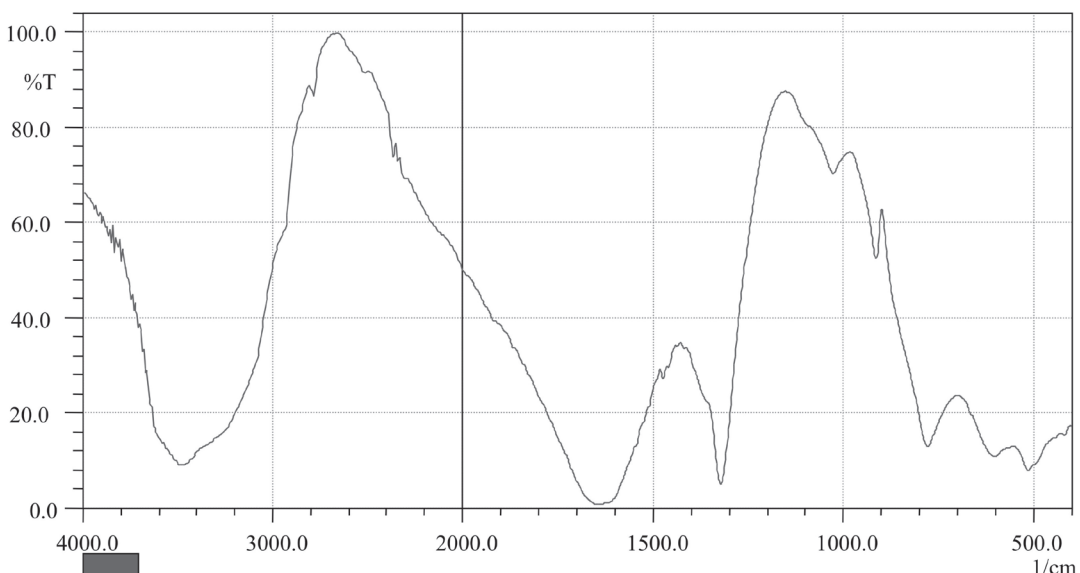
SLIKA 1.
Infracrveni apsorpcijski
spektar čistoga kalcij
oksalata monohidrata
(Whewellite)

FIGURE 1.
Infrared absorption
spectrum of pure
calcium oxalate
monohydrate
(Whewellite)



SLIKA 2.
Infracrveni apsorpcijski
spektar čistoga kalcij
oksalata dihidrata
(Whedellite)

FIGURE 2.
Infrared absorption
spectrum of pure
calcium oxalate
dihydrate
(Whedellite)



Rezultati i diskusija

Za djelotvorno medicinsko praćenje osoba koje stvaraju mokraćne kamence nužna je točna analiza njihovoga kemijskog sastava koja podrazumijeva i definiranje kristalnih formi u kojima se javljaju. Infracrvena spektroskopija jedna je od fizikalnih metoda koja u cijelosti ispunjava navedene zahtjeve. Ona je jedna od spektroskopskih metoda koja mjeri apsorpciju elektromagnetskoga zračenja koje odgovara energijama koje nastaju uslijed vibracija i rotacija atoma u molekulama. Kao izvor zračenja koristi se područje infracrvenoga dijela spektra koje prolazeći kroz sprešani uzorak mokraćnoga kamenca u prozirnoj KBr pastili kao rezultat analize daje karakterističan infracrveni apsorpcijski spektar. On je visoko specifičan za svaki pojedini kemijski spoj. Identifikacija dobivenih spektara moguća je na osnovi položaja dobivenih apsorpcijskih maksimuma u spektru koji su karakteristični za svaku pojedinu kemijsku skupinu. Interpretacija rezultata analize kemijskoga sastava mokraćnih kamenaca postiže se usporedbom dobivenih infracrvenih apsorpcijskih spektara s odgovarajućim spektrima kemijski čistih supstanci.

Odjel za kliničku laboratorijsku dijagnostiku, Kliničkoga bolničkog centra Osijek jedan je od rijetkih kliničkih laboratorija u široj regiji koji u svojoj svakodnevnoj praksi koristi IR spektroskopiju. Ta fizikalna tehnika uvedena je u naš laboratorij 1989. godine i koristi se uglavnom za analizu kemijskoga sastava kamenca. Najčešći su uzorci za analizu mokraćni kamenci. Uzorci za analizu dolaze kao izmokrene krhotine bubrežnih kamenaca nakon postupka litotripsije na Klinici za urologiju, KBC-a Osijek ili kao operativno odstranjeni mokraćni kamenci ili kao spontano izmokreni bubrežni kamenci poslani u naš laboratorij na analizu iz različitih dijelova Hrvatske.

U navedenom razdoblju analizirano je 3120 mokraćnih kamenaca od kojih su 75% kalcijski, a 25% su bili nekalcijski mokraćni kamenci. Najčešće su u sastavu prisutni kalcij oksalat u dvije forme kao monohidrat i kao dihidrat. Primjeri infracrvenoga apsorpcijskoga spektra kalcij oksalata monohidrata prikazan je na Slici 1.

Slika 1. daje prikaz IR spektra s tri karakteristična apsorpcijska maksimuma u području oko 1613, 1315 i 780,6 cm^{-1} koji jasno ukazuju na prisutnost kalcij oksalata u uzorku kamenca. Karakteristični apsorpcijski maksimumi za kalcij oksalat monohidrat nalaze se u području 3058-3488 cm^{-1} a predstavljaju vibracije hidratacijske vode $\nu(\text{O-H})$, $\delta(\text{H-O-H})$, dok apsorpcijski maksimum na 1620 cm^{-1} predstavlja vibracije karbonilne skupine $\nu(\text{C=O})$, zatim karakteristični apsorpcijski maksimumi na 780,6 cm^{-1} $\delta(\text{O-C-O})$, 518,2 cm^{-1} $\rho(\text{O-C-O})$ i kod 419,4 cm^{-1} $\omega(\text{O-C-O})$ [9].

Na slici 2. prikazan je karakteristični infracrveni apsorpcijski spektar kalcij oksalata dihidrata.

Slika 2. prikazan je IR spektar kalcij oksalata dihidrata s karakterističnim apsorpcijskim maksimumima na 517,3 cm^{-1} $\rho(\text{O-C-O})$, 780,6 cm^{-1} $\delta(\text{O-C-O})$, 1643 cm^{-1} $\nu(\text{C=O})$ i između 3058 i 3488 cm^{-1} a predstavljaju vibracije hidratacijske vode $\nu(\text{O-H})$.

Za razlikovanje i identifikaciju te dvije hidratne forme kalcij oksalata koristi se područje spektra između 1600 cm^{-1} i 600 cm^{-1} .

Infracrveni apsorpcijski spektri mokraćnih kamenaca u kojima je prisutno više kemijskih spojeva često su vrlo kompleksni i interpretacija u takvim slučajevima zahtijeva posebnu pažnju i iskustvo. U takvim slučajevima poželjno je odvojeno analizirati dijelove kamenca koji se makroskopski gledano razlikuju najčešće prema boji kamenca. Ukoliko se pak radi o cjelovitom nehomogenom mokraćnom kamencu potrebno je

odvojeno analizirati pojedine njegove dijelove, jezgru, slojeve i ovojnicu i tako ih prikazati u gotovom nalazu.

Zaključak

Metoda FTIR spektroskopije dobar je izbor za svakodnevnu analizu bubrežnih kamenaca jer za kratko vrijeme daje vrijedne podatke u obliku njihovoga točnog kemijskog sastava koji su nužni za razjašnjenje etiopatogeneze urolitijaze. Pažljiva morfološka i strukturalna analiza mokraćnih kamenaca daje važne informacije o većini fizikalno-kemijskih uvjeta koji pridonose stvaranju kamenaca. Sastav kamenca može pomoći u rekonstrukciji fizikalno-kemijskih i metaboličkih događanja koja su prethodila njegovom nastanku.

Osim što zadovoljava zahtjeve u smislu pouzdane i cjelovite analize mokraćnih kamenaca, prednost FTIR spektroskopije je u tome da ne zahtijeva veliku količinu uzorka. Pogodna je za svakodnevnu rutinsku praksu u laboratoriju, a može se koristiti i u druge svrhe (toksikologija, izdisajni testovi i sl.)

LITERATURA

1. Wilkinson H. Clinical investigation and management of patients with renal stones. *Ann Clin Biochem.* 2000;38:180-7.
2. Gyory AZ, Ashby R. Calcium salt urolithiasis. Review of theory for diagnosis and management. *Clin Nephrol.* 1999;51:197-208.
3. Hesse A. Technik der infrarotspektroskopischen Harnsteinanalyse. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1982;20:861-73.
4. Daudon M, Bader CA, Jungers P. Urinary calculi: review of classification methods and correlations with etiology. *Scanning Microsc.* 1993;7:1081-104.

ANALYSIS COMPOSITION OF KIDNEY STONES BY FTIR SPECTROSCOPY: TWENTY YEARS EXPERIENCE

Vatroslav Šerić¹, Vesna Babić-Ivančić^{2,4}, Hrvoje Kuveždić^{2,3}, Antun Tucak²

¹Clinical Hospital Center Osijek, Division of Clinical Laboratory Diagnostics, J. Huttlera 4, 31000 Osijek, Croatia

²Faculty of Medicine Osijek, J. J. Strossmayer University Osijek, J. Huttlera 4, 31000 Osijek, Croatia,

³Clinical Hospital Center Osijek, Urology Clinic, J. Huttlerova 4, 31000 Osijek, Croatia

⁴ Ruđer Bošković Institut, Bijenička 54, 10000 Zagreb, Croatia

Corresponding author: Vatroslav Šerić

Klinički bolnički centar Osijek, Odjel za kliničku laboratorijsku dijagnostiku, J. Huttlera 4, 31000 Osijek, Hrvatska,

Professional paper

ABSTRACT

Accurate and reliable analysis of composition with the definition of crystal components that are part of calculus is a prerequisite for effective medical surveillance of persons forming kidney stones. It can greatly facilitate the assessment and treatment in such cases.

To determine the composition of the stones used in numerous physical and chemical techniques. FTIR spectroscopy is a physical method for the analysis of the stones used require sophisticated instrumentation and a comparison sample of known standards. The paper presents twenty years clinical laboratory experience in IR analysis of kidney stones.

The main crystalline material that can be found in the stones are divided into six main groups: calcium oxalate, calcium phosphate, infectious stones, urate stones cystine and others.

Key words: Urolithiasis; Kidney calculi – chemistry, epidemiology, urine; Spectroscopy, near-infrared - methods